

由硫酸卡那霉素注射液中杂质的变化探讨处方和灭菌工艺的合理性

赵敬丹, 刘浩*, 张含智

(上海市食品药品检验研究院, 上海 201203)

摘要: 通过硫酸卡那霉素注射液中主药卡那霉素和功能性辅料枸橼酸钠的相容性研究, 对制剂处方进行评价, 探讨处方中枸橼酸钠添加浓度和该处方条件下灭菌工艺的合理性。采用经优化的高效液相色谱-蒸发光散射检测系统 (HPLC-ELSD) 分别测定原研药和国产制剂中枸橼酸钠的含量和杂质谱; 采用新建的柱后衍生化-HPLC-荧光检测系统 (FLD) 分析某些特定杂质的量和枸橼酸钠含量的相关性; 结合特定杂质的质谱 (MS) 裂解规律, 探讨处方及灭菌工艺的合理性。结果显示: 国产注射液中枸橼酸钠的含量是原研药的近 40 倍; 通过系列加速对比实验 (121 °C), 提示某些未知杂质和枸橼酸钠的含量相关; 结合其质谱裂解规律, 推测上述杂质主要为卡那霉素和枸橼酸钠的反应产物。因此, 国内药品生产企业在处方筛选时应关注处方的合理性, 并结合主药和辅料的理化特性选择适当的灭菌工艺, 保证临床用药的安全性。同时, 对于主药结构中含有伯氨基的药物, 在处方设计中应关注辅料的相容性问题。

关键词: 卡那霉素; 枸橼酸钠; 辅料相容性; 杂质谱; 衍生化

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)06-1683-06

Formulation and sterilization assessment of kanamycin sulfate injection based on impurity profiles

ZHAO Jing-dan, LIU Hao*, ZHANG Han-zhi

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: The compatibility of kanamycin with sodium citrate for the formulation of kanamycin sulfate injection was determined, including optimization of the amount of sodium citrate in the injection and the sterilization process. An HPLC coupled with an evaporative light scattering detector (ELSD) was used to measure the amount of sodium citrate and the impurity profiles. A validated post-column derivatization HPLC coupled with a fluorescence detector (FLD) was used to determine the correlation between specific impurities in a domestic factory and sodium citrate, and then the formulation was evaluated by HPLC coupled with mass detector (MS) characterization of degradation products. The results show that the amount of sodium citrate in kanamycin sulfate injection from a domestic factory is about 40 times higher than that of the Meiji formulation. Several specific impurities can be detected in solutions heated under simulated sterilization conditions (121 °C), which were correlated with the amount of sodium citrate. Impurities were characterized by HPLC-MS/MS, and data showed that the identified impurities were interaction products of kanamycin and sodium citrate. These results indicate that greater attention should be directed at formula optimization in domestic factories, as it is crucial to the safety and efficacy of the preparations. Drug-excipient chemical compatibility should also be evaluated in the development of pharmaceutical dosages forms especially when the active pharmaceutical ingredients have a primary amine group.

Key words: kanamycin; sodium citrate; drug-excipient chemical compatibility; impurity profile; derivatization

收稿日期: 2021-01-18; 修回日期: 2021-04-20.

基金项目: 2019 年国家药品标准提高项目 (2019H02).

*通讯作者 Tel: 13788965965-6202, E-mail: liuhao1968@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0104

卡那霉素 (kanamycin, 图 1) 由 Hamao Umezawa 于 1957 年发现^[1], 1958 年由日本明治制果药业株式会社首先开发生产, 1966 年我国从云南西双版纳土壤中分离得到卡那霉素链霉菌, 并研究试制成功国产的卡那霉素^[2], 临床主要剂型为注射液。我国生产的硫酸卡那霉素注射液共有 129 个批准文号, 其他来源包括国内企业 A (供出口) 和日本明治制果药业株式会社 (原研)。不同来源的硫酸卡那霉素注射液辅料使用情况详见表 1。

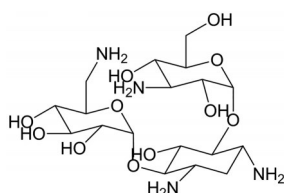


Figure 1 Structure of kanamycin

在杂质谱研究过程中发现: 国内企业 A 的产品中杂质数量和杂质含量明显较其他企业的产品高^[3-5]。经分析, 处方中使用了高浓度的枸橼酸钠。处方中同样含有枸橼酸钠的原研注射液及不含枸橼酸钠的国内企业 C 的产品在相应保留时间处并未见明显杂质。采用经优化的 HPLC-ELSD 系统, 将含卡那霉素和较高浓度枸橼酸钠的混合溶液加热破坏后 (121 °C), 在枸橼酸保留时间附近均出现明显的色谱峰, 而这些杂质在其他破坏条件下得到的样品色谱图中均未检出。故需探讨是否加热条件催化了卡那霉素与枸橼酸钠的反应。

鉴于 HPLC-ELSD 法的检测灵敏度较低, 故采用新建的灵敏度较高的柱后衍生-HPLC-FLD 法验证枸橼酸钠和卡那霉素的相容性。同时对原研及国内企业 A 产品中的枸橼酸钠含量进行测定, 以期探讨处方及相应灭菌工艺的合理性。

为了进一步考察反应机制, 通过离线二维 HPLC-MS 手段对上述杂质的裂解规律进行分析, 并对主要杂质的结构进行了推测, 以便为处方的合理设计提供依据。

材料与方法

仪器 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司, 配备荧光检测器); 2000ES 型蒸发光散射检测器

(美国 Alltech 公司); VECTOR PCX 柱后衍生化系统 (美国 Pickering 公司); 1290-6550 Q/TOF 质谱仪 (美国 Agilent 公司)。

对照品与试剂 卡那霉素对照品 (批号 R088K0, 纯度 79%, 美国药典对照品); 卡那霉素 B (批号 130548-200501, 中国食品药品检定研究院); 2-脱氧链霉胺 (批号 BCBT5899, 97%, 美国 Aldrich 公司); 脱氧链霉胺卡那胺 (批号 7-APD-119-1, 加拿大 TRC 对照品); 枸橼酸 (批号 L570R59, 99.5%)、邻苯二甲醛 (批号: LS20R22) (北京百灵威科技有限公司); 三氟乙酸 (美国 Tedia 公司, 批号: 14100608); 庚烷磺酸钠 (日本 TCI 公司, 批号: AKXUG-DQ); 无水硫酸钠 (美国 Sigma 公司, 批号: BCBZ9014); 甲醇 (美国 Merck 公司, 批号: I1074107 006); 水为 Milli-Q 超纯水; 其余试剂均为分析纯。

试药 硫酸卡那霉素注射液来自不同的生产企业: 企业 A、企业 B (原研) 和企业 C。

HPLC-ELSD 色谱条件 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱 (Welch LP-C18, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 0.2 mol·L⁻¹ 三氟乙酸溶液-甲醇 (98:2) 为流动相; 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 柱温为 30 °C; 进样体积为 20 μL; 蒸发光散射检测器检测 (漂移管温度: 80 °C, 载气流量 3.0 L·min⁻¹)。

HPLC-FLD 色谱条件 采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱 (Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 mm×100 mm, 3.5 μm), 以 pH3.4 缓冲液 (取庚烷磺酸钠 8.7 g 和无水硫酸钠 32 g, 加水溶解并稀释制成 2 L, 用冰醋酸调节 pH 值至 3.4±0.1)-甲醇 (95:5) 为流动相 A, pH 3.4 缓冲液-甲醇 (60:40) 为流动相 B, 进行梯度洗脱; 0~30 min, 100% A→80% B; 30~31 min, 80% B→100% B; 31~35 min, 100% B。流速为 1.1 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 进样体积为 5 μL。

柱后衍生化试剂: 取邻苯二甲醛 0.8 g, 加甲醇 300 mL 使溶解, 加巯基乙醇 2 mL 和硼酸盐缓冲液 (取硼酸 36 g 和氢氧化钠 21.5 g, 加水溶解并稀释至 2 L, 调节 pH 值至 10.4±0.1) 700 mL, 混匀, 滤过; 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 衍生化反应温度为 35 °C; 荧光检测器激发波长为 340 nm, 发射波长为 455 nm。

HPLC-MS 条件 液相条件: 采用二烷基丙基硅

Table 1 Excipients used in kanamycin injection from different sources

Product from different sources	Strength	Excipient
Manufacturer A	2 mL: 500 mg and 4 mL: 1 000 mg	Sodium bisulfite (0.5% W/V); sodium citrate
Other domestic manufacturers	2 mL: 0.5 g	Sodium bisulfite (0.2%–0.3% W/V); EDTA-2Na (0.01%–0.03% W/V); cysteine hydrochloride (0.1%–0.2% W/V); sodium citrate (0.1% W/V); sodium acetate (0.1% W/V); disodium hydrogen phosphate (0.2% W/V)
Meiji, Japan	4 mL: 1 000 mg	Sodium bisulfite (0.05% W/V); methylparaben (0.045% W/V); ethylparaben (0.005% W/V); sodium citrate

烷键合硅胶为色谱柱 (Inertsil DIOL, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸溶液-甲醇 (10:90) 为流动相, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描; 毛细管电压 3 500 V, 鞘气温度 225 °C, 鞘气流速 11 L·min⁻¹, CID 电压 20~40 eV。

HPLC-ELSD 系统样品溶液

供试品溶液 分别精密量取来源为 A~C 的硫酸卡那霉素注射液适量, 加水定量稀释制成每 1 mL 中分别约含卡那霉素 2 mg 的溶液。

酸破坏溶液 量取来源为 A 的硫酸卡那霉素注射液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 25% 的硫酸溶液 2 mL, 80 °C 水浴加热 30 min, 取出, 放置至室温。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

碱破坏溶液 量取来源为 A 的硫酸卡那霉素注射液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 2 mL, 121 °C 加热 2 h, 取出, 放置至室温, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

氧化破坏溶液 量取来源为 A 的硫酸卡那霉素注射液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 过氧化氢溶液 5 mL, 90 °C 加热 1 h, 取出, 放置至室温, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

高温破坏溶液 量取来源为 A 的硫酸卡那霉素注射液 2 mL, 置 20 mL 顶空瓶中, 121 °C 加热 2 h, 取出, 放置至室温, 用水将内容物全部逐渐转移至 25 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。

光照破坏溶液 量取来源为 A 的光照 (照度 5 000 lx, 紫外灯能量 100 μw) 10 天的硫酸卡那霉素注射液适量, 加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 2 mg 的溶液。

枸橼酸对照品溶液 取枸橼酸对照品适量, 精密称定, 加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中分别约含 0.1、0.2 和 0.3 mg 的溶液。

HPLC-FLD 系统样品溶液

供试品溶液及高温破坏溶液 分别精密量取“HPLC-ELSD 系统样品溶液”项下相应溶液, 加水定量稀释制成每 1 mL 中分别约含卡那霉素 0.5 mg 的溶液。

企业 A 高温破坏溶液 2 (添加 0.1% W/V 枸橼酸钠) 量取硫酸卡那霉素注射液 2 mL, 加 0.1% W/V 枸橼酸钠, 照“HPLC-ELSD 系统样品溶液”项下的高温破坏条件实验, 精密量取适量, 加水定量稀释制成每 1 mL 中约含卡那霉素 0.5 mg 的溶液。

企业 A 高温破坏溶液 3 (添加 0.2% W/V 枸橼酸钠) 量取硫酸卡那霉素注射液 2 mL, 加 0.2% W/V 枸橼酸钠, 照“高温破坏溶液 2”项下的高温破坏条件实验, 精密量取适量, 加水定量稀释制成每 1 mL 中约含卡那霉素 0.5 mg 的溶液。

企业 A 模拟处方溶液 (不含枸橼酸钠) 取处方量卡那霉素原料、亚硫酸氢钠和硫酸适量, 加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含卡那霉素 0.5 mg 的溶液。

企业 A 高温破坏溶液 4 量取上述溶液 2 mL, 照“高温破坏溶液 2”项下的高温破坏条件实验, 精密量取适量, 加水定量稀释制成每 1 mL 中约含卡那霉素 0.5 mg 的溶液。

结果

1 HPLC-ELSD 色谱系统测定

HPLC-ELSD 系统样品溶液典型色谱图见图 2。结果显示, 企业 A 样品中的杂质峰明显多于原研和国内企业 C; 在高温 (121 °C) 条件下, 杂质 8、杂质 9 和杂质 10 的量明显增加; 同样均含有枸橼酸钠, 企业 A 中枸橼酸钠的量明显比原研高。

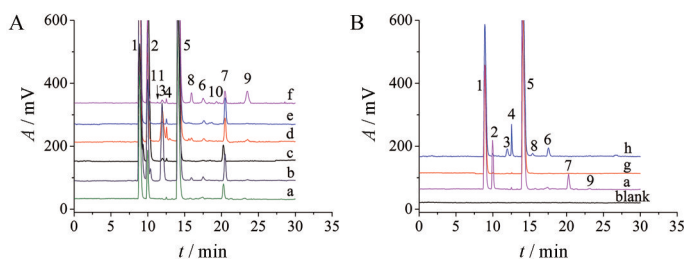


Figure 2 HPLC chromatograms in ELSD system. A: Typical chromatograms of specificity tests of kanamycin sulfate injection; B: Chromatograms of kanamycin sulfate injection from different manufacturers. a: Sample solution from manufacturer A; b: Acid degradation sample solution; c: Base degradation sample solution; d: Oxidation sample solution; e: Light sample solution; f: Heat degradation sample solution; g: Sample solution from manufacturer B; h: Sample solution from manufacturer C. 1: SO₄²⁻ and SO₃²⁻; 2: Na⁺; 3: Deoxystreptamine-kanosaminide and 4-O-(6-amino-6-deoxy- α -D-glucopyranosyl)-2-deoxy-D-streptomine); 4: Kanamycin D; 5: Kanamycin; 6: Kanamycin B; 7: Citric acid; 8-10: Unknown impurities; 11: 2-Deoxystreptamine

经计算, 企业 A 中枸橼酸钠含量约为 $22 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 原研样品中枸橼酸钠含量约为 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。企业 A 的样品中枸橼酸钠含量是原研的近 40 倍。

2 HPLC-FLD 色谱系统测定

HPLC-FLD 系统样品溶液典型色谱图见图 3。

结果显示, 和原研及企业 C 相比, 企业 A 样品的色谱图中出现一系列色谱保留行为比卡那霉素 D 弱的色谱峰; 上述杂质在不含枸橼酸钠的处方溶液经加热破坏后未检出 (图 3d); 图 3a、3e、3f 和 3g 对比显示, 企业 A 的供试品溶液 121°C 加速加热破坏后, 2-脱氧链霉胺和卡那霉素 D 之间的杂质峰总量明显增加, 这些杂质含量的增加和溶液中枸橼酸钠含量具有一定的相关

性。经初步推测, 上述杂质可能为高温下枸橼酸钠和卡那霉素的系列反应产物。HPLC-ELSD 系统中卡那霉素主峰后所有杂质 (除卡那霉素 B 峰外) 均在 HPLC-FLD 系统中的 2-脱氧链霉胺和卡那霉素 D 之间洗脱, 枸橼酸钠和卡那霉素系列反应产物在两个色谱系统中相互对应。

3 枸橼酸钠和卡那霉素主要反应产物结构的质谱推测

结合卡那霉素的质谱裂解规律 (图 4) 和图 2 中色谱峰 8~10 的质谱信息, 结构推测见图 5 和表 2。

结果显示, 模拟处方样品溶液在 121°C 条件下加热处理后出现的多个未知杂质峰为卡那霉素和枸橼酸钠的一系列反应产物。

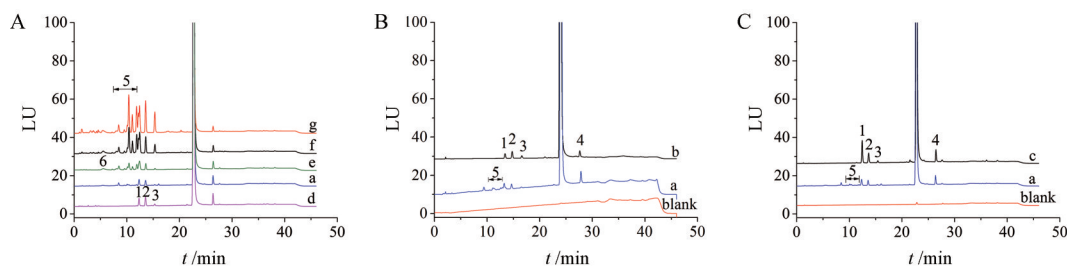


Figure 3 HPLC Chromatograms in FLD system. A: Heat degradation solutions of kanamycin sulfate; B: Chromatograms of kanamycin sulfate injection from manufacturer A and B; C: Chromatograms of kanamycin sulfate injection from manufacturer A and C. a: Sample solution from manufacturer A; b: Sample solution from manufacturer B; c: Sample solution from manufacturer C; d: Heat degradation solution of simulated sample solution; e: Heat degradation solution of kanamycin sulfate injection from manufacturer A; f: Heat degradation solution of kanamycin sulfate injection from manufacturer A added 0.1% sodium citrate; g: Heat degradation solution of kanamycin sulfate injection from manufacturer A added 0.2% sodium citrate. 1: Kanamycin D; 2: 4-*O*-(6-Amino-6-deoxy- α -*D*-glucopyranosyl)-2-deoxy-*D*-streptomine); 3: Deoxystreptamine-kanosaminide; 4: Kanamycin B; 5: Unknown impurities; 6: 2-Deoxystreptamine

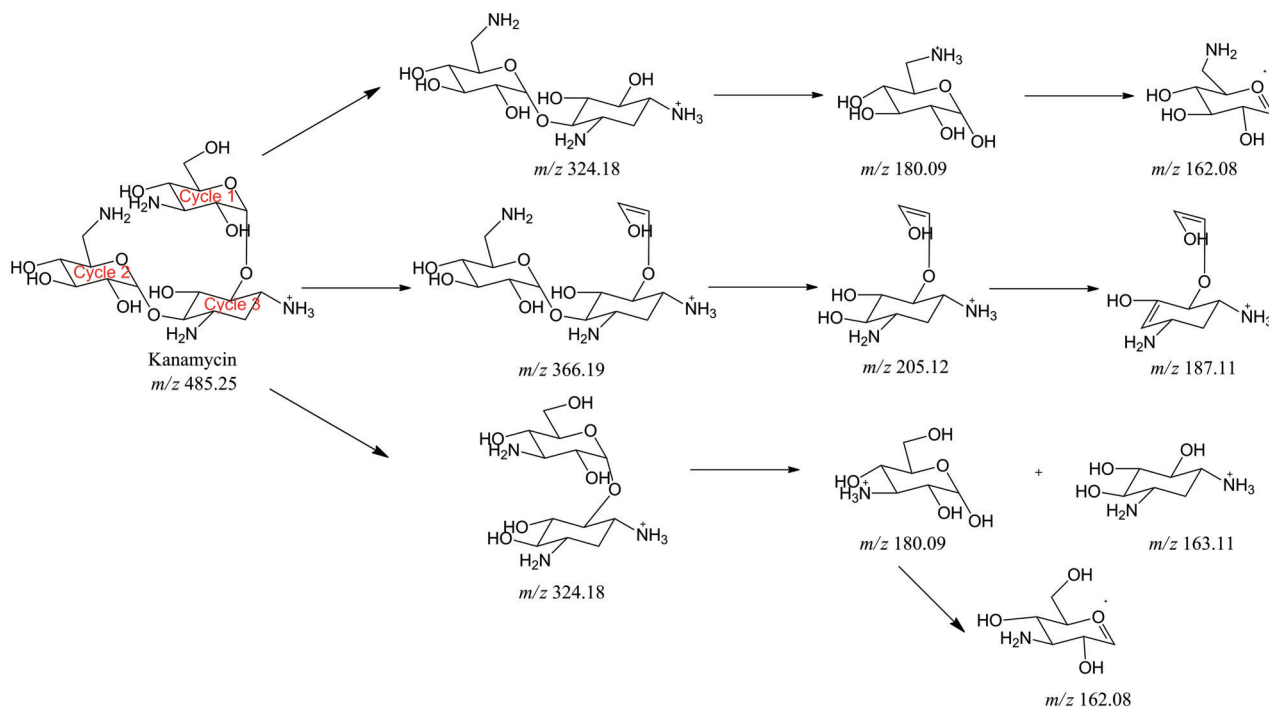


Figure 4 Fragmentation pattern of kanamycin

讨论

枸橼酸钠在注射液中常被用作 pH 调节剂及抗氧化剂的协同剂, 使用范围为 0.02%~0.4%^[6]。研究发现: 国内企业 A 样品中的杂质数量明显大于原研和国内企业 C 样品中的杂质数量。专属性实验显示, 在高温 (121 °C) 条件下, 样品溶液中各杂质的含量明显增加;

经处方分析, 企业 A 样品中枸橼酸钠的含量是 (2.2% *W/W*) 原研产品的近 40 倍, 并且已远超出推荐使用量; 杂质含量的增加和溶液中枸橼酸钠含量的增加具有相关性。对加热破坏样品中杂质进行离线 HPLC 半制备及质谱分析, 结果显示样品溶液加热后产生的杂质为枸橼酸和卡那霉素的一系列反应产物。提示生产企业

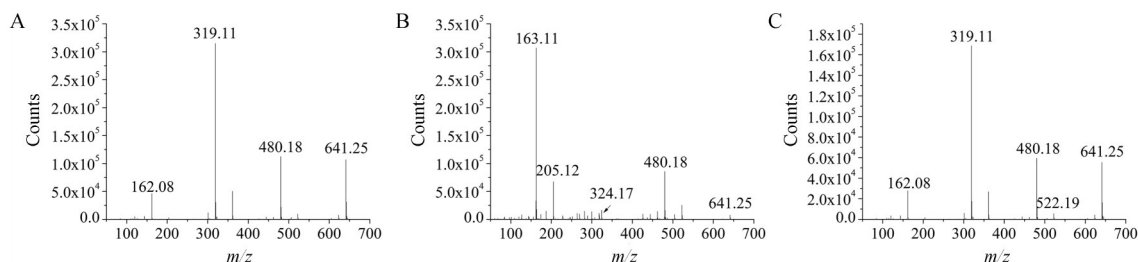
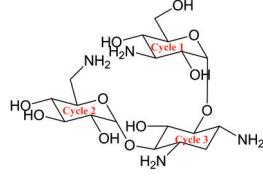
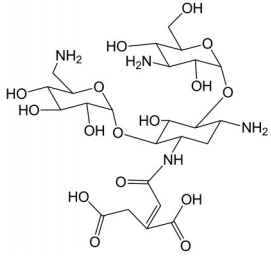
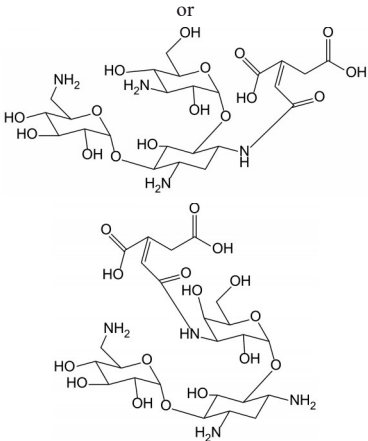
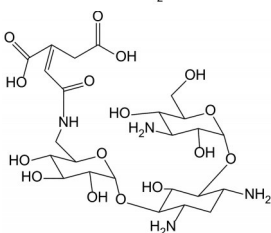


Figure 5 Line spectra of impurity 8 (A), 9 (B) and 10 (C) in positive ESI mode

Table 2 MS data and fragments of impurities formed in kanamycin injection with high concentration of sodium citrate

Name	Molecular ion peak	Observed mass	Major fragment ion	Possible structure	Mechanism
Kanamycin	$[C_{18}H_{36}N_4O_{11}+H]^+$	485.25	366.19, 324.18, 205.12, 187.11, 180.09, 163.11		/
Impurity 8 in figure 2f	$[C_{18}H_{36}N_4O_{11}+C_6H_8O_7-2H_2O+H]^+$	641.25	480.18, 319.11, 162.08		By-product of sodium citrate with the primary amine on cycle 3
Impurity 9 in figure 2f	$[C_{18}H_{36}N_4O_{11}+C_6H_8O_7-2H_2O+H]^+$	641.25	480.18, 324.18, 205.12, 163.11		By-product of sodium citrate with the primary amine on cycle 1
Impurity 10 in figure 2f	$[C_{18}H_{36}N_4O_{11}+C_6H_8O_7-2H_2O+H]^+$	641.25	522.19, 480.18, 319.11, 162.08		By-product of sodium citrate with the primary amine on cycle 2

在处方筛选时,未关注辅料和主成分的相容性,并且未考察灭菌工艺对产品关键质量属性的影响,最终造成产品有效性和安全性方面的隐患。

辅料的选择对制剂的质量起着关键的作用^[7,8],特别是对于含活泼氨基的药物,在辅料筛选时,应特别关注药物和含活泼基团辅料的相容性,确保产品的安全性^[9]。辅料并不完全是惰性的,很多辅料与药物主要成分的相互作用会影响制剂的质量、安全性和有效性,一致性评价中应关注功能性辅料可能对产品质量的影响。

作者贡献: 赵敬丹主要完成了所有实验的操作、数据处理、文章撰写及编辑部修改意见的核修等。刘浩主要进行了相关技术指导。张含智主要参与卡那霉素质谱裂解规律的指导。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Umezawa H, Ueda M, Maeda K, et al. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1957, 10: 181-188.
- [2] Zhang YH, Jiang MH, Qin F, et al. Determination of the content in kanamycin sulfate injection and eye drops by HPLC with post-column derivatization [J]. *Chin J Antibio (中国抗生素杂志)*, 2019, 44: 88-93.
- [3] Zhao JD, Liu H. Comparison of determination methods for related substances of kanamycin sulfate injection by HPLC-ELSD and HPLC-FLD [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2020, 51: 1311-1316.
- [4] Zhao JD, Liu H. Evaluation and application of HPLC-ELSD in impurity profile detection of kanamycin sulfate injection [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2021, 41: 117-123.
- [5] Jiang MH, Zhao JD, Zhang HZ, et al. Impurity Profile of Kanamycin Monosulfate [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2018, 49: 656-661.
- [6] Rowe RC, Sheskey PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients (药用辅料手册)* [M]. 4th Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 7.
- [7] Constantinides PP, Chakraborty S, Shukla D. Considerations and recommendations on traditional and non-traditional uses of excipients in oral drug products [J]. *AAPS Open*, 2016, 2: 3-8.
- [8] Bharete SS, Bharate SB, Bajaj AN. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review [J]. *J Excip Food Chem*, 2010, 1: 3-26.
- [9] Zhang HZ, Shi JG, He J, et al. Impurity detection method and preparation method of metamaminol bitartrate injection: CN, 201911329897.1 [P]. 2020-04-10.